

(1)

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-153966

(43)公開日 平成6年(1994)6月3日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/57	Z N A			
C 0 7 K 13/00		8517-4II		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		9281-4B	5/ 00	B
審査請求 未請求 請求項の数7(全 12 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平4-312242	(71)出願人	000005968 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成4年(1992)11月20日	(72)発明者	下村 猛 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(72)発明者	山田 和徳 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(72)発明者	森本 裕紀 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 長谷川 曉司 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なタンパク質およびそれをコードする遺伝子

(57)【要約】

【構成】 1本鎖の肝実質細胞増殖因子(HGF)を活性型の2本鎖HGFに変換させる活性を持つヒト血清由来のプロテアーゼをコードする遺伝子をクローニングして、そのDNA配列を決定し、また同タンパク質のアミノ酸配列を推定した。バクテリアにより形質転換された同遺伝子を含む大腸菌およびCHO細胞中に同タンパク質を産生させた。

【効果】 上記遺伝子を導入した形質転換体を培養して得られる培養液から該タンパク質を容易に、大量かつ安定して得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするタンパク質。

【請求項2】 請求項1記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項3】 配列表の配列番号2に記載の塩基配列で表される核酸配列を部分配列として含有してなることを特徴とする請求項2記載の遺伝子。

【請求項4】 配列表の配列番号3に記載の塩基配列で表されることを特徴とする請求項2記載の遺伝子。

【請求項5】 プロモーターの下流に、請求項2記載の遺伝子を該遺伝子によってコードされるポリペプチドを発現するように組み込んだ発現ベクター。

【請求項6】 請求項5記載のベクターで宿主細胞を形質転換させて得られた形質転換体。

【請求項7】 請求項6記載の形質転換体を培養して配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で表されるタンパク質を産生させる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する形質転換体およびそれを用いたタンパク質の産生法に関し、詳細には肝実質細胞増殖因子（HGF）を特定の位置で切断して不活性の1本鎖型から活性を有する2本鎖型へ変換させるプロテアーゼ活性を有する新規なタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する形質転換体およびそれを用いたタンパク質の産生法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 ヒトHGFの生理活性は、*in vitro*の実験において1本鎖型では見られず、2本鎖型になった場合のみ発現されることが確認されている。またヒトHGFを遺伝子組換えの手法を用いて生産する場合、無血清培養下では産生されるヒトHGFの大半は1本鎖型であることも確認されている。培養時における血清の添加の有無は製造コストに大きな影響を及ぼすものであることから、無血清培養下でHGFを生産する方法が望まれていた。

【0003】 本発明者らの一部は先に、哺乳動物の血清中にかかる1本鎖型HGFを2本鎖型に変換するプロテアーゼが存在し、このプロテアーゼは、SDS-ポリア

ク質をコードする遺伝子を初めて取得し、その結果遺伝子工学的手法を用いて該タンパク質を大量生産できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】 すなわち本発明の要旨は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で表されることを特徴とするタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子がコードするポリペプチドを発現するベクター、形質転換体およびこれらを用いた当該タンパク質の産生法に存する。以下、本発明につき詳細に説明する。

10 【0006】 本発明における新規タンパク質は、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であり、1本鎖型HGFを2本鎖型HGFに変換するプロテアーゼ活性を損なわない範囲で、一部のアミノ酸を除去、置換、修飾または追加する等の改変を行ったものも本発明に含まれる。上記タンパク質をコードする遺伝子としては、例えば配列表の配列番号2に記載の塩基配列で表される核酸配列を部分配列として含有してなるものや、配列表の配列番号3に記載の塩基配列で表されるもの等が挙げられる。

20 【0007】 かかる遺伝子のDNA断片は、例えば以下のようにして得ることができる。本発明のタンパク質をコードするcDNAライブラリーとしては、市販のヒト肝臓から調整されたものが利用できる。このcDNAライブラリーから、フエーゲン法を斎藤らの方法（プロシージャイングス オブ ナショナル アカデミー サイエンス コーレス ー [Proc. Natl. Acad. Sci. USA], 83, 8664-8668 (1986))により感染させ、培養する。培養後に形成されたコロニーを、部分DNA断片あるいは本発明のタンパク質の部分アミノ酸配列に対応する塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法（「モレキュラー クローニング」、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー、320-328 (1982)）によって選択し、目的とするDNA断片を得ることができる。

30 【0008】 このコロニーハイブリダイゼーション法に使用するプローブとしては、ポリヌクレオチド反応（以下、「PCR」と略す）法（サイエンス [Science], 239, 487-491 (1988)）によって得られる本発明タンパク質をコードする遺伝子の部分DNA断片が用いられる。具体的には、配列表の配列番号1（配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列の一

部）をコードするDNA断片を合成し、これをプローブとして用いる。

【0004】

【発明の効果】 本発明は、新規なタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する形質転換体およびそれを用いたタンパク質の産生法を提供する。本発明は、肝実質細胞増殖因子（HGF）を特定の位置で切断して不活性の1本鎖型から活性を有する2本鎖型へ変換させるプロテアーゼ活性を有する新規なタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する形質転換体およびそれを用いたタンパク質の産生法に関する。

本発明は、肝実質細胞増殖因子（HGF）を特定の位置で切断して不活性の1本鎖型から活性を有する2本鎖型へ変換させるプロテアーゼ活性を有する新規なタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する形質転換体およびそれを用いたタンパク質の産生法に関する。本発明は、肝実質細胞増殖因子（HGF）を特定の位置で切断して不活性の1本鎖型から活性を有する2本鎖型へ変換させるプロテアーゼ活性を有する新規なタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する形質転換体およびそれを用いたタンパク質の産生法に関する。

6

【0021】発現ベクターに上記のような選択マーカー遺伝子が挿入されていない場合には、形質転換体の選択マーカーを有するベクター、例えば pSV2Neo (ジャーナル オブ モレキュラー ブાયオロジイ [J. Mol. Biol.] 151, 1327 (1982))、pMBG (ネイチャー [Nature], 294, 228 (1981))、pSV2gpt (プロシーグイ [Proc. Natl. Acad. Sci. USA], 78, 2072 (1981))、pAd-D26-1 (ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジイ [J. Mol. Biol.] 151, 1327 (1982)) 等を当該タキソ

【0025】このペースを2M尿素を含む0.1%重炭酸アンモニウム溶液に溶解し、TPCK-オートリブライズ（マイルス・ラボラトリー社製）またはTLCK（ギブ

（イ）濃度 0% から 80% まで 1 時間の濃度勾配溶出を有し、 β 数の 1/2 程度断片を得た。

Journal of Management Education 36(8)>

処理したガラスフィルターに添加し、Applied Biosystems社製\$470Aシーケンサーでエドマン分解し、アミノ酸配列を決定した。フェニルチオヒダントイン(PTH)アミノ酸の同定は、三菱化成社製のMC1 gel ODS IHU (0.46×1.5cm)カラムを用い、酢酸緩衝液(10mM酢酸緩衝液、pH4.7、0.01%SDSおよび3.8%アセトニトリル)による単一溶媒溶出を流速1.2mL/分、温度43℃で行い、PTHアミノ酸の検出は269nmの吸光度で行った。これらのうち下の方の2つのバ

グチドのアミノ酸配列を、配列表の配列番号6および7に示す。

実施例2 PCR法による本発明タンパク質の部分DNA断片の調製

基質DNAは市販のヒト肝臓cDNAバンク(クイッククローニングヒューマンリバーcDNA、クローンテック社製)を用いた。PCRは、パーキン・エルマー・シータスDNAサーマルサイクラー(Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler)を使用して、シータ・アンプ・キット(Gene Amp DNA Amplification Reagent Kit、宝酒造製)を使って行った。基質DNA(1ng相当量)、10倍濃度の反応緩衝液(500mMKCl、100mMトリス塩酸バッファー(pH8.3)、15mMMgCl₂および0.1%(w/v)ゼラチン)10μlおよびそれぞれ10mMのdGTP、dATP、dCTP、dTTPを2μlずつ、プライマー#1として配列表の配列番号4に記載の+鎖DNAプライマーおよびプライマー#2として配列表の配列番号5に記載の-鎖DNAプライマーをそれぞれ1種類(1配列)のプライマーが0.1μMになるようにして、Taq DNAポリメラーゼ0.5μlを加えて、滅菌脱イオン水で100μlの容積とする。反応は94℃、10分間の前処理後、94℃で1分間(変性ステップ)、37℃で2分間(延伸ステップ)および72℃で3分間(伸長ステップ)のインキュベーションを30サイクル行った。最後に72℃で7分間のインキュベーションを行い、反応を終了した。

【0027】得られた反応液をフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈澱を行った。この沈澱を21.5μlの滅菌脱イオン水に溶解した後、10

amHI部位に挿入した後、常法に従って塩基配列を決定した。決定したPCRフラグメントの塩基配列を、配列表の配列番号2に示す。

実施例3 本発明タンパク質をコードする完全長DNA断片を含むクローンのスクリーニング

上記実施例2で作製した323bpのPCR断片をモレキュラー・クローニング(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、1982年)に記載の方法に従い、3P標識することによりスクリーニング用プローブとした。スクリーニング用のライブラリーとしては、ブライト・ラムダ・ファーン・ライブラリー(ストラテジーン社製)49才男性由来ヒト肝臓cDNAライブラリーを用いた。大腸菌はXL1-Blue(ストラテジーン社製)を用い、約500万ブラクとなるように上記のファーンを感染させ、NZY培地で1晩生育させた後、デュボン社製のシー・スクリーン・ガラスにトランスファーさせた。そのメンブレンを0.1M水酸化ナトリウム-0.5M塩化ナトリウムが染み込んだろ紙上に2分間静置し、続いて1.5M塩化ナトリウム-0.5Mトリス塩酸バッファー(pH7.5)が染み込んだろ紙上で5分間静置した。このフィルターの処理を更に2回繰り返した後、2×SSC(2倍SSC)でフィルターを洗浄し、乾いたろ紙上で風乾した。次にこのメンブレンに120mJ/cm²のUV照射を行うことにより、メンブレンに移したDNAの固定を行った。

【0029】こうして処理したメンブレン5枚を、50mMトリス塩酸バッファー(pH7.5)、1M塩化ナトリウムおよび1%SDSよりなる溶液50mlに浸漬し、65℃で2時間保持した。次に上記のP標識プローブ5ng/ml、鮭精子DNA100μg/ml、50mMトリス塩酸バッファー(pH7.5)、1M塩化ナトリウムおよび1%SDSよりなる溶液40mlに浸漬し、65℃で16時間保持した。その後メンブレンを取り出し、2×SSCで室温5分間、0.1×SSCで室温30分間2回の順に洗浄した後、常法に従ってオートラジオグラフィを行い、12ライブラリー40個を得た。

実施例4 DNA断片のサブクローニングおよび塩基配列の決定

実施例3で得られたポジティブのファーンクローンより、エキシジョン(excision)法により直接プラスミドはいた。シングルブローックより500μlのS

トリス緩衝液を添加し、100μlの抽出液を抽出し、200μlの抽出液と200μlのXL1-Blueおよび1μlのpUC19.8を混合し、これを37℃で15分間処理した。その後、100μlの抽出液と200μlの抽出液とを混合し、これを37℃で15分間処理した。その後、100μlの抽出液と200μlの抽出液とを混合し、これを37℃で15分間処理した。

【0030】このようにして、12ライブラリー40個を得た。

【0031】このようにして、12ライブラリー40個を得た。その後、100μlの抽出液と200μlの抽出液とを混合し、これを37℃で15分間処理した。その後、100μlの抽出液と200μlの抽出液とを混合し、これを37℃で15分間処理した。その後、100μlの抽出液と200μlの抽出液とを混合し、これを37℃で15分間処理した。

4000gで5分間遠心分離し、上清を得た。上清の100倍希釈液20 μ lをXL1-Blue 200 μ lと混ぜ、37℃で15分間処理した後、その内2 μ lをアンピシリン40 μ g/mlを含むLB寒天培地に播いた。出現してきたコロニーのうち24個のプラスミドを取得、解析し、最も長い挿入断片を持つクローン(pBHGFP)につき塩基配列を決定した。決定した塩基配列を、配列表の配列番号3に示す。この塩基配列をもとに本発明のタンパク質のアミノ酸配列(配列表の配列番号1)を決定した。

実施例5 発現プラスミドの調製

図1に、本発明タンパク質発現プラスミドの調製方法を示す。

【0030】実施例3で得られたプラスミド(pBHGFAP)を基質DNAとした。PCRは、パーキンエルマー ジーナス DNA サーマル サイクル (Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler) を使用して、ジーン アンプレキット (Gene Amp DNA Amplification Reagent Kit、宝酒造製) を使って行った。基質DNA1 μ l (0.5 μ g相当量)、10倍濃度の反応緩衝液 (500mMKCl、100mMトリス塩酸バッファー (pH8.3)、15mMMgCl₂および0.1% (w/v) ゼラチン) 10 μ lおよび1.25mMの4dNTPをそれぞれ16 μ lずつ、20 μ Mのプライマー#3 (一鎖DNAプライマー: 配列表の配列番号8) およびプライマー#4 (一鎖DNAプライマー: 配列表の配列番号9) を各5 μ l、Taq DNAポリメラーゼ0.5 μ lを加えて、滅菌脱イオン水で100 μ lの系とする。反応は94℃、10分間の前処理後、94℃で1分間 (変性ステップ)、52℃で1.5分間 (アニーリングステップ) および72℃で2分間 (伸長ステップ) のサイクルを22サイクル行った。最後に72℃で7分間のインキューションを行い、反応を終了した。得られた反応液をフェノール:クロロホルム=1:1で抽出し、エタノール沈澱を行った。この沈澱を16 μ lの滅菌脱イオン水に溶解した後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、862bpのバンドを常法に従って切り出してDNAフラグメントを回収し、エタノール沈澱を行った。

【0031】このようにして得られたDNA断片を常法

ールに従った。このようにして得られた組換え体から常法によりミニスクリーニングを行い、目的とする926bpのインサートを有するプラスミドpSHGFAPを得た。次にpSHGFAP 8 μ gを制限酵素BamHIおよびXhoIで切断し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈澱を行った。この沈澱を16 μ lの滅菌脱イオン水に溶解した後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行って920bpのバンドを常法に従って切り出してDNAフラグメントを回収し、エタノール沈澱を行った。このようにして得られたDNA10ngと、あらかじめ制限酵素BamHIおよびXhoIで切断し、アルカリフォスファターゼ処理したpcDNA1/Neoプラスミド5ngをライゲーションキットを用いてライゲーションし、大腸菌DH5を形質転換させた。コンピカントセルはコンピカントハイを用い、添付のプロトコールに従った。このようにして得られた組換え体から常法によりミニスクリーニングを行い、目的のプラスミドpNSHGFAPを得た。

実施例6 本発明タンパク質の大腸菌による発現

実施例5で作製されたプラスミドpSHGFAPを保持する大腸菌を、10mlのLB (50 μ g/mlのアンピシリン含有) 培地に接種して37℃で一晩 (12~16時間) 培養し、この培養液を10mlのLB (50 μ g/mlのアンピシリン含有) 培地に1/100量 (0.1ml) 加えて37℃で2時間培養した後、ペクター上に存在するlacプロモーターの転写誘導剤であるインプロピル β -Dチオガラクトシド (IPTG) を終濃度が1mMになるように添加し、さらに37℃で6時間培養した。培養液1mlから菌体を遠心分離により集め、この菌体中で発現された当該タンパク質を常法に従いウエスタンブロッティング法により検出を試みたところ、確かに発現されていることが明らかになった。これに対してIPTG無添加の場合、あるいは上記発現プラスミドpSHGFAPを含まない大腸菌株を用いた場合には、発現が確認されなかった。

実施例7 本発明タンパク質を細胞的に発現する動物細胞株の取得

実施例5で作製された発現ペクターpcDNA1/Neoの制限酵素切断部位に当該タンパク質cDNAが挿入されたプラスミドpNHGFAPを、Maniatisらの方法 ("モルキュラー クローニング", コールド

スプリング・ラボラトリー、ニュージャージー州、米国) に従って、大腸菌プラスミドペクターpUC18 (20ng) とを混合し、ライゲーションキット (宝酒造製) を用いてライゲーションを行った。このようにして得られた組換え

プラスミドpNHGFAPを、Maniatisらの方法 ("モルキュラー クローニング", コールドスプリング・ラボラトリー、ニュージャージー州、米国) に従って、大腸菌プラスミドペクターpUC18 (20ng) とを混合し、ライゲーション

blishing Associates and Wiley-InterScience], 9・1・1章—9・1・4章(1987))を基にCHO細胞を形質転換した。即ち、まず直径9cmのシャーレの中で、FBS(牛胎児血清)が10%入ったERDF培地(極東製薬社製)中でCHO細胞をセミコンフルエントな状態になるまで培養した。次にシャーレから培地を除き、そこにDNA溶液を滴加するが、該DNA溶液は予め以下の手順に従って調製した。まず直径9cmのシャーレ一枚につき300 μ lの2 \times HEBS溶液(1.6%塩化ナトリウム、0.074%塩化カリウム、0.05%リン酸水素二ナトリウム12水塩、0.2%デキストロスおよび1%HEPES(pH7.05))および10 μ gのプラスミドDNAを加え、滅菌された水で570 μ lに合わせた溶液をエポンドルフ遠心管中に準備する。次に該DNA溶液に、30 μ lの2.5M塩化カルシウム溶液を滴加しながらボルテックスミキサーを用い数秒間激しく混和する。これを室温で30分間放置する。

【0033】このようにしてできたDNA溶液を前述の細胞にかけて、室温で30分間静置した。その後FBSが10%入ったERDF培地9mlをシャーレに入れて、5%CO₂存在下、37℃で4～5時間培養した。次にシャーレから培地を除き、5mlの1 \times TBS++溶液(25mMトリス塩酸バッファー(pH7.5)、140mM塩化ナトリウム、5mM塩化カリウム、0.6mMリン酸水素二ナトリウム、0.08mM塩化カルシウムおよび0.08mM塩化マグネシウム)で細胞を洗浄し、1 \times TBS++溶液を除去した後、グリセロールを20%含む1 \times TBS++溶液5mlを細胞にかけて室温で1～2分間静置し、上清を除去した。その後5mlの1 \times TBS++溶液で細胞を再び洗浄し、FBSが10%入ったERDF培地10mlをシャーレに入れ

配列

Ala Leu Ser Trp Glu Tyr Cys Arg Leu Glu Ala Cys Glu Ser Leu Thr
1 5 10 15
Arg Val Gln Leu Ser Pro Asp Leu Leu Ala Thr Leu Pro Glu Pro Ala
20 25 30
Ser Pro Gly Arg Gln Ala Cys Gly Arg Arg His Lys Lys Arg Thr Phe
35 40 45
Leu Arg Pro Arg Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu Pro Gly Ser His
50 55 60

Ser Pro Pro Arg Asp Ser Val Ser Val Val Leu Gly Gln His Phe Phe
100 110

て5%CO₂存在下、37℃で培養した。培養48時間が経過した時点で培地を除き、5mlの1 \times TBS++溶液で細胞を洗浄した後、トリプシン処理を行って細胞をシャーレより剥かし、9cmシャーレ一枚分の細胞を9cmシャーレ10枚に分けて、薬剤G418(G413硫酸塩(GENETICIN)、GIBCO社製)を200 μ g/mlの濃度になるように加えて培養を続けた。その後10日経過した時点で生き残ったG418耐性の細胞を単離し、24ウェルプレートを用い、10%FBSを含むERDF培地1ml中で7日間培養した。その後血清を含まないERDF培地に代えて培養を続け、72時間後個々の培養液を集め、限外ろ過濃縮後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。これを常法に従ってウェスタンブロッティングを行い、当該タンパク質の発現を確認した。

【0034】

【発明の効果】本発明により、1本鎖HGFを活性型の2本鎖HGFに変換するプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする新規なDNA断片が得られ、その塩基配列が明らかにされた。その当該タンパク質遺伝子を挿入された発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、当該タンパク質を大量、安定、かつ容易に生産することが可能になると考えられる。

【0035】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：300

配列の型：アミノ酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ヒト

13 14
 Pro Tyr Thr Leu Tyr Ser Val Phe Asn Pro Ser Asp His Asp Leu Val
 130 135 140
 Leu Ile Arg Leu Lys Lys Lys Gly Asp Arg Cys Ala Thr Arg Ser Gln
 145 150 155 160
 Phe Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Glu Pro Gly Ser Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Gly His Lys Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly His Leu Asp Glu Asn Val
 180 185 190
 Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Val Pro Leu Val Ala
 195 200 205
 Asp His Lys Cys Ser Ser Pro Glu Val Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro
 210 215 220
 Asn Met Leu Cys Ala Gly Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln
 225 230 235 240
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys Glu Lys Asn Gly Val Ala Tyr
 245 250 255
 Leu Tyr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Asp Gly Cys Gly Arg Leu His Lys
 260 265 270
 Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp Ile Asn Asp
 275 280 285
 Arg Ile Arg Pro Pro Arg Arg Leu Val Ala Pro Ser
 290 295 300

【0036】配列番号：2

配列の長さ：329

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

直接の起源：Quick-clone™ ヒト肝臓cDNA (Clontech社製)

配列

GGATCC CAG ATT GCG GGC TGG GGC CAC TTG GAT GAG AAC GTG AGC GGC 48
 Gln Ile Ala Gly Trp Gly His Leu Asp Glu Asn Val Ser Gly
 1 5 10
 TAC TCC AGC TCC CTG CGG GAG GCC CTG GTC CCC CTG GTC GCC GAC CAC 96
 Tyr Ser Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Asp His
 15 20 25 30
 AAG TGC AGC AGC CCT GAG GTC TAC GGC GCG GAC ATC AGC CCC AAC ATG 144
 Lys Cys Ser Ser Pro Glu Val Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro Asn Met
 35 40 45
 CTC TGT GCC GGC TAC TTC GAC TGC AAG TCC GAC GCC TGC CAG GGG GAC 192
 Leu Cys Ala Gly Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln Gly Asp
 50 55 60
 TCA GGG GGG CCC CTG GCC TGC GAG AAG AAC GGC GTG GCT TAC CTC TAC 240
 Leu Ser Pro Leu Ala Cys Gln Lys Asn Gly Val Ala Tyr Leu Tyr
 80 85 90
 GTC TAC ACC CGC GCG GCC AAC TAT GTG GAC TGG AT GGAATC 329
 Val Tyr Thr Val Ala Met Tyr Trp Val Asp Trp

【0037】配列番号：3

配列の長さ

配列の型：核酸
鎖の数：2本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：cDNA

配列

GCGCGCTCTC CTGGGAGTAC TGCCGCCTGG AGGCCTGCGA ATCCCTCACC AGAGTCCAAC 60
TGTCACCGGA TCTCCTGGCG ACCCTGCCTG AGCCAGCTC CCCGGGGCGC CAGGCCGTGCG 120
GCAGGAGGCA CAAGAAGAGG ACGTTCCTGC GGCCACGTAT CATCGGGGCG TCCTCCTCGC 180
TGCCCGGCTC GCACCCCTGG CTGGCCGCCA TCTACATCGG GGACAGCTC TGCGCCGGGA 240
GCCTGGTCCA CACCTGTCTG GTGGTGTCTG CCGCCCTCTG CTCTCCAC AGCCCCCA 300
GGGACAGCGT CTCGTGGTG CTGGCCAGC ACTCTCTCAA CCGCACGACG GACGTGACGC 360
AGACCTTCGG CATCGAGAAG TACATCCCGT ACACCTTGTA CTGGGTGTTT AACCCGAGCG 420
ACCACGACCT CGTCTGATC CGGCTGAAGA AGAAAGGGGA CCGCTGTGCC ACACGCTCGC 480
AGTTCGTGCA GCCCATCTGC CTGCCCGAGC CCGGCAGCAC CTTCCTCCCA GGACACAAGT 540
GCCAGATTGC GGGCTGGGGC CACTTGGATG AGAAGTGAG CCGCTACTCC AGCTCCCTGC 600
GGGAGGCCCT GGTCCCTCTG GTGCCCGACC ACAAGTGAAG CAGCCCTGAG GTCTACGGCG 660
CCGACATCAG CCCAACATG CTCTGTGCCG GCTACTTCCA CTGCAAGTCC GACGCTGCC 720
AGGGGGACTC AGGGGGGCC CTGGCCTGCG AGAAGAACGG CGTGGCTTAC CTCTACGGCA 780
TCATCAGCTG GGGTGACGGC TGGGGGCGC TCCACAAGCC GGGGTCTAC ACCCGCTGG 840
CCAACATGT GGAATGGATC AACGACCGGA TACGGCTTCC CAGGCGGCTT GTGGCTCCCT 900
CCTGACCCTC CAGCGGGACA CCCTGGTTCC CACCAATCCC TGCTTGTCTG ACAATAAAGA 960
TATTTCCAAG 970

【0038】配列番号：4

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列

CTCGGATCCC ARATNGCNGG NTGGGG

26

R : G or A, N : A, G, C or T

【0039】配列番号：5

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列

CTCGGATCCA TCARTCNAC RTARTT

26

R : G or A, N : A, G, C or T

【0040】配列番号：6

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly

配列

Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly

1

5

【0041】配列番号：7

配列の長さ：5

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ヒト

直接の起源：Pre-made Lambda phage Library、ヒト肝臓（49才、男）cDNA Library（Stratagene社製）

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

起源

生物名：ヒト

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

10 起源

生物名：ヒト

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間フラグメント

起源

生物名：ヒト

配列

Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly

配列の長さ：10

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

17

18

生物名：ヒト

配列

GTCCAACTGT CACCGGATC

19

【0043】配列番号：9

配列の長さ：19

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

起源

生物名：ヒト

配列

CGCTCGAGGG TCAGGAGGG

19

【0044】配列番号：10

配列の長さ：71

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状：

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

起源

生物名：ヒト

配列

AATTCGGATC CATGAAGGTT CTGTGGGCTG CGTTGCTGGT CACATTCCTG GCAGGATGCC 60

GCCTAG GTACTTCCAA GACACCCGAC GCAACGACCA GTGTAAGGAC CGTCCTACGG

AGGCCAAGGT G

71

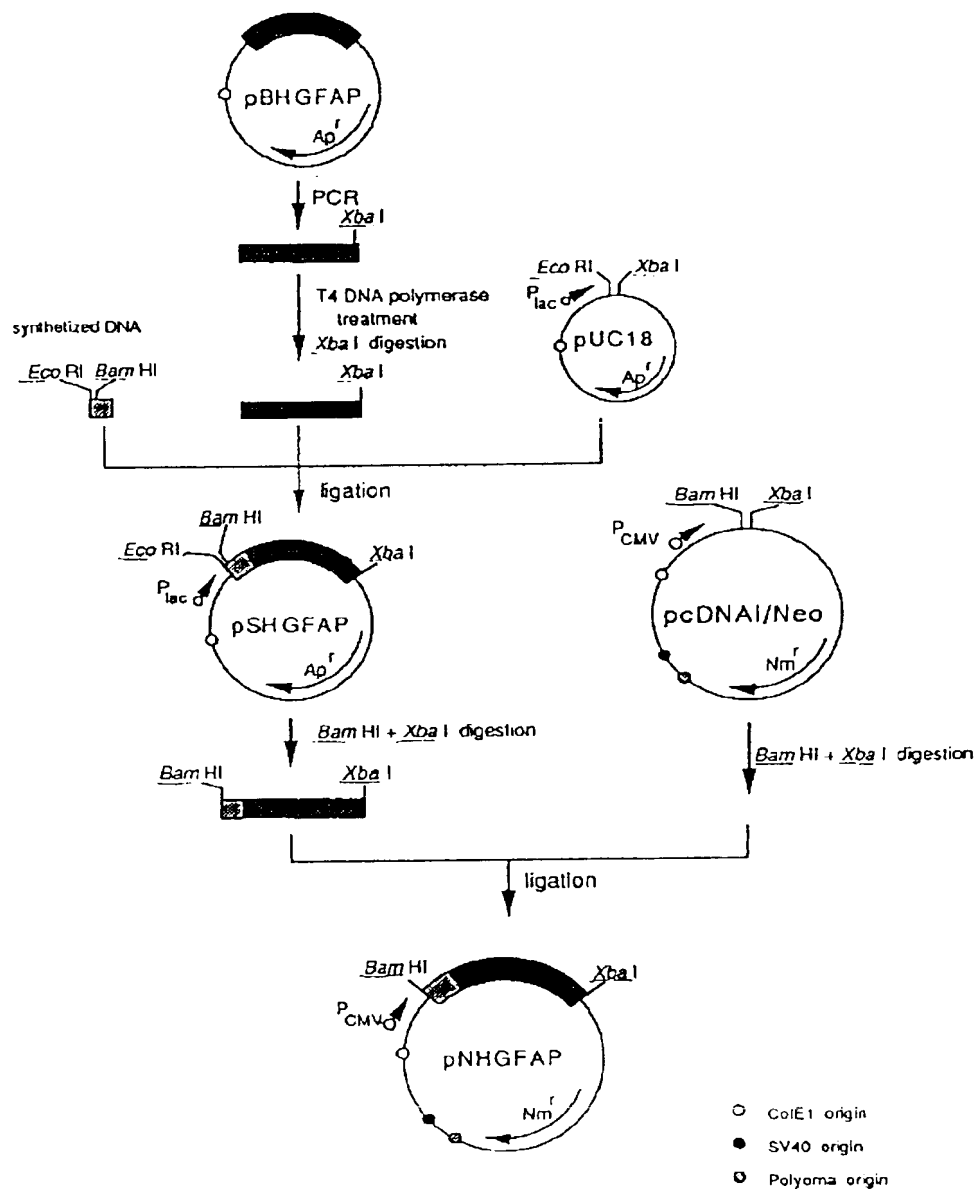
TCGGTTCCA C

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明タンパク質発現プラスミドの調製方法を示した図である。図中、P_{lac}は大腸菌lacプロモーター、P_αはサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、A_rはアンピシリン耐性遺伝子、N_rはネオマイシン耐性遺伝子を表す。

10 ター、P_αはサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、A_rはアンピシリン耐性遺伝子、N_rはネオマイシン耐性遺伝子を表す。

【図1】



1000-0000-0000-0000

C12P 2102

C12N 121

C12P 2102

C12P 2102

C 8214 413

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 喜多村 直実
大阪府守口市八雲東町2-82-21-910

(72)発明者 宮澤 恵二
兵庫県芦屋市高浜町3-1-524